

Estudo da prevalência e do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Angus, Nelore e cruzados, criados em áreas endêmicas do Estado de São Paulo



rebanho Angus - São José do Rio Preto, SP



rebanho Nelore - Colina, SP



rebanho cruzado (1/2 Angus+ 1/2 Nelore) - São Carlos, SP

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 37

**Estudo da prevalência e do nível
de infecção por *Babesia bovis* e
Babesia bigemina em bovinos da
raça Angus, Nelore e cruzados,
criados em áreas endêmicas do
Estado de São Paulo**

Márcia Cristina de Sena Oliveira
Talita Barban Bilhassi
Rodrigo Giglioti
Adriana Mércia Guaratini Ibelli
Wilson Malagó Junior
Henrique Nunes de Oliveira

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2014

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

13560 970, São Carlos, SP

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3411- 5600

Fax: (16): 3361-5754

Home page: www.embrapa.br/pecuaria-sudeste

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Berndt

Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura

Membros: Ane Lisye F.G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,

Milena Ambrosio Telles, Sônia Borges de Alencar

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

Foto(s) da capa: Talita Barban Bilhassi

1ª edição

1ª edição on-line (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Oliveira, Márcia Cristina de Sena

Estudo da prevalência e do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Angus, Nelore e cruzados, criados em áreas endêmicas do Estado de São Paulo. [Recurso eletrônico] / Márcia Cristina de Sena Oliveira et al. – Dados eletrônicos. – São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2014.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <[http://www.cpps.eembrapa.br/080servicos/](http://www.cpps.eembrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/Boletim37.pdf/view.>)

070publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/Boletim37.pdf/view.>

26 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37
ISSN: 1980-6841.

1. Gado de corte – *Babesia bovis* – Infecção - Estudo. 2. Gado de corte - *Babesia bigemina* - Infecção - Estudo. I. Oliveira, Márcia Cristina de Sena. II. Talita Barban Bilhassi. III. Giglioti, Rodrigo. IV. Ibelli, Adriana Mércia Guaratini. VI. Junior, Wilson Malagó. VI. Oliveira, Henrique Nunes de. VII. Título. VIII. Série.

CDD: 636.089

© Embrapa 2014

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 7 |
| Introdução | 9 |
| Material e Métodos | 11 |
| Animais e colheita de amostras para análise | 11 |
| Processamento das amostras | 12 |
| Reações de qPCR | 12 |
| n-PCR para diagnóstico das infecções por <i>B. bigemina</i> nos animais da raça Nelore | 14 |
| Análise estatística | 15 |
| Resultados e discussão | 16 |
| Referências | 22 |

Estudo da prevalência e do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Angus, Nelore e cruzados, criados em áreas endêmicas do Estado de São Paulo

Márcia Cristina de Sena Oliveira¹

Talita Barban Bilhass²

Rodrigo Giglioti³

Adriana Mércia Guaratini Ibelli⁴

Wilson Malagó Junior⁵

Henrique Nunes de Oliveira⁶

Resumo

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi usada para avaliar a prevalência e o nível de infecção por *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos de corte criados em áreas endêmicas para as babesioses no estado de São Paulo, onde os animais são expostos continuamente ao carrapato *Rhipicephalus microplus*. Amostras de sangue foram colhidas de 25 vacas e 25 bezerros das raças Angus e Nelore e da primeira geração do cruzamento entre Angus e Nelore (AxN), totalizando 150 animais. As amostras de sangue da veia jugular foram usadas para extração de DNA e determinação do volume globular (VG), enquanto o sangue colhido de veias periféricas foi usado para a detecção microscópica de parasitas. As amostras de DNA de cada animal foram submetidas à amplificação por meio da reação em cadeia da qPCR, utilizando “primers” específicos para *B. bovis* e *B. bigemina*. O exame microscópico dos esfregaços sanguíneos não

¹ Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, marcia.sena-oliveira@embrapa.br

² Aluna de doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, talitabarban@yahoo.com.br

³ Aluno de pós-doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, rodrigogiglioti@yahoo.com.br

⁴ Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, adriana.ibelli@embrapa.br

⁵ Analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, wilson.malago@embrapa.br

⁶ Professor do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, holiveira@fcav.unesp.br

possibilitou a identificação de animais adultos com parasitemia patente por *Babesia* spp.; mas *B. bigemina* foi encontrada em esfregaços de oito bezerros, sendo seis Angus, um Nelore e um AxN. A comparação das médias de VG entre os grupos genéticos mostrou que Nelore e AxN não diferiram entre si, enquanto que Angus apresentou média significativamente menor que os outros dois grupos ($p < 0,05$). Com relação à idade, as médias de VG foram significativamente maiores para os bezerros que para as vacas ($p < 0,05$). O número de cópias de DNA de *B. bovis* foi maior ($p < 0,05$) para os animais Angus, em comparação aos Nelore e AxN, tanto para vacas como para bezerros, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os dois últimos grupos genéticos. As amostras de DNA dos bovinos Nelore não puderam ser quantificadas pela qPCR para *B. bigemina*, devido provavelmente às baixas concentrações do DNA alvo. O número de cópias de DNA de *B. bigemina* encontrado nas amostras de sangue dos animais Angus e AxN foi maior para os bezerros que para as vacas, e para os animais Angus, em comparação ao grupo AxN ($p < 0,05$). No entanto, pôde-se verificar que a prevalência da infecção por esse parasita não diferiu daquela encontrada para *B. bovis*, nos dois grupos genéticos estudados.

Palavras chave: bovinos, babesioses, resistência.

Prevalence and level of infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Angus, Nelore and cross cattle in endemic areas of São Paulo state

Abstract

The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to estimate the prevalence and level of *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection in beef cattle raised in endemic areas for babesiosis in São Paulo state, where the animals were continuously exposed to *Rhipicephalus microplus* ticks. Blood samples were collected from 150 animals (75 cows and 75 calves) of Angus and Nelore breeds and the first generation of an Angus and Nelore cross (AxN). Blood samples from the jugular vein were used for DNA extraction and determination of packed cell volume (PCV), while samples from peripheral veins were used for microscopic parasite detection. The DNA samples from each animal were subjected to amplification by qPCR using specific primers for *B. bovis* and *B. bigemina*. Microscopic examination of blood smears did not allow the identification of adult animals with patent *Babesia* spp. parasitemia, but *B. bigemina* was found in smears from eight calves, six Angus, one Nelore and one AxN. The comparison of PCV between genetic groups showed that Nelore and AxN did not differ, while PCV in Angus was significantly lower than in the other two groups ($p < 0.05$). Regarding age, the mean PCV was significantly higher in calves than in cows ($p < 0.05$). The number of copies of *B. bovis* DNA was higher ($p < 0.05$) for Angus, compared to Nelore and AxN for cows and calves, but no significant differences between

the last two groups were found. *B. bigemina* could not be quantified by qPCR in blood samples from Nellore, probably due to the low concentrations of the target DNA. The number of copies of *B. bigemina* DNA found in blood samples was higher for calves than for cows and for Angus compared to AxN ($p < 0.05$). However, it could be seen that the prevalence of infection with this parasite did not differ from that found for *B. bovis*, in the two genetic groups.

Key words: cattle, babesiosis, resistance.

Introdução

Entre as principais causas sanitárias de perdas produtivas em bovinos criados nos trópicos está o carrapato *Rhipicephalus microplus* e os hemoparasitas que ele transmite. A babesiose bovina é uma hemoparasitose provocada por *Babesia bovis* e *B. bigemina*, protozoários transmitidos exclusivamente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. Os bovinos que se recuperam da infecção primária por esses parasitas desenvolvem forte imunidade, mas se tornam portadores assintomáticos, atuando como transmissores da doença (KESSLER et al., 1983). Sabe-se que as babesias persistem no organismo dos bovinos, provavelmente devido à ocorrência de fenômenos de citoadesão ao endotélio vascular do hospedeiro e variação antigênica entre as diferentes cepas (ALLRED et al., 1994; AL-KHEDERY; ALLRED, 2006). Nas infecções por *B. bovis*, a excessiva produção de citocinas e de outras substâncias relacionadas à resposta imune contribuem para o agravamento da doença, inclusive com a ocorrência de lesões no sistema nervoso central dos hospedeiros (BOCK et al., 2004; AL-KHEDERY, ALLRED, 2006; CHAUVIN et al., 2009).

R. microplus encontra-se amplamente distribuído entre os paralelos 32°N, passando pelo sul dos Estados Unidos, região mediana do México e norte da África, e 32°S, cortando o sul do Brasil, centro do Uruguai e da Argentina e sul da Austrália (GONZÁLES, 2003). No Brasil o complexo carrapato/tristeza parasitária provoca grandes prejuízos aos pecuaristas (GRISI et al., 2002), e é considerado um fator limitante para o aumento da produtividade dos rebanhos de corte que poderia ser obtido por meio do uso de bovinos taurinos. Como é amplamente conhecida a resistência dos bovinos zebuínos aos carrapatos (OLIVEIRA et al., 1989; GOMES, 1998; JONSSON et al., 2000), a grande maioria dos criadores optam por criar esses animais, ainda que sejam considerados potencialmente menos produtivos que os taurinos.

Quanto à suscetibilidade às babesioses, há evidências de que a raça também interfira no grau de infecção por esses hemoparasitas, seguindo o mesmo padrão observado para carrapatos, com os animais taurinos apresentando maior suscetibilidade (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997, 1999; JONSSON et al., 2000).

A ocorrência de diferenças na resistência/suscetibilidade às babesioses dentro de raças foi identificada por Benavides e Sacco (2007), que observaram a ocorrência de três fenótipos: resistentes, intermediários e suscetíveis, ao desafiarem animais “naïve” das raças Hereford e Aberdeen Angus com uma cepa patogênica de *B. bovis*. A definição dos três fenótipos foi feita tendo como base dados de volume globular sanguíneo (VG) e nível da parasitemia, detectado por exames diretos de esfregaços de sangue. Com a finalidade de verificar se existiam diferenças nas prevalências das infecções por *B. bigemina* em bovinos taurinos e zebuínos criados nas mesmas pastagens, em área endêmica do estado de São Paulo, Oliveira et al. (2008) usaram a técnica de “nested” PCR (nPCR) e não encontraram diferenças. Apesar de os genes envolvidos na expressão da resistência a essas doenças ainda não serem conhecidos, sabe-se que são características hereditárias e assim, existe a possibilidade de apresentarem resposta à seleção.

O melhor controle das babesioses depende do desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos, que possam detectar animais com infecção persistente em diferentes raças de bovinos. Atualmente o uso de técnicas baseadas em PCR tornou possível estimar a prevalência e o nível da infecção por esses hemoparasitas em bovinos portadores sadios, assim como em fêmeas de carrapatos e seus ovos (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2006; BULING et al., 2007; GUERRERO et al., 2007).

Como existem evidências da ocorrência de animais e raças de bovinos mais resistentes às babesioses, o melhoramento genético poderia ser usado como uma estratégia alternativa para o controle dessas doenças. Assim, este experimento foi desenvolvido com a finalidade estimar as médias de volume globular, das prevalências e dos níveis

de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em animais das raças Angus (*Bos taurus taurus*), Nelore (*B. t. indicus*) e cruzados (AxN), criados em áreas endêmicas para as babesioses no estado de São Paulo, a fim de verificar a influência da raça e da idade dos animais sobre esses parâmetros e suas inter-relações.

Material e Métodos

Animais e colheita de amostras para análise

Foram usados bovinos oriundos de três propriedades rurais localizadas no estado de São Paulo, onde os animais são expostos a infestações pelo carrapato *R. microplus* durante todos os meses do ano. Os animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) eram criados em Colina (20°43'05" S e 48°32'38" W), os da raça Angus (*Bos t. taurus*) em São José do Rio Preto (20°49' 11"S e 49°22' 46" W) e os cruzados Angus/Nelore (AxN) em São Carlos (22°01'S e 47°53'W). Na impossibilidade de se obter as amostras dos animais dos três grupos genéticos criados na mesma propriedade, foram escolhidos rebanhos onde eram observados carrapatos durante todos os meses do ano e todos os animais permaneceram sem tratamento carrapaticida pelo período mínimo de 30 dias antes das colheitas. De cada raça foram colhidas duas amostras de sangue de cada animal, sendo 25 vacas com idades entre três e cinco anos e 25 bezerros com idades entre um e quatro meses, totalizando 150 animais. As colheitas foram feitas entre os meses de agosto/2010 e maio/2011. As amostras de sangue foram colhidas em veia jugular usando tubos com o anticoagulante EDTA, em sistema a vácuo (Becton Dickinson). Essas amostras foram usadas para extração de DNA e para a determinação do volume globular (VG). As amostras de sangue colhidas dos vasos da orelha foram usados para preparar esfregaços de sangue, para pesquisa de hemoparasitas por meio de exame microscópico.

Processamento das amostras

Para a determinação do nível de parasitemia pelo método direto, os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa. Os hematozoários foram pesquisados em toda a lâmina, foram contados todos os eritrócitos parasitados em 1.000 células observadas e os resultados foram expressos em porcentagem (%). As leituras foram feitas utilizando-se microscópio óptico com ocular reticulada e objetiva de imersão de 100x. O VG foi determinado pela técnica de microhematócrito (JAIN, 1993). As amostras de DNA foram extraídas de 300 µl de sangue usando o kit DNA Easy (Invitrogen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies Inc.; Wilmington, Delaware, USA). Todas as amostras foram identificadas e mantidas em congelador a -80°C até o momento das análises.

Reações de qPCR

A qPCR foi padronizada utilizando-se uma adaptação do protocolo descrito por Buling et al. (2007), empregando-se o termociclador ABI 7500 Real Time PCR System. Na padronização foram utilizadas amostras de DNA positivas para *B. bovis* e *B. bigemina* extraídas de sangue de animais clinicamente afetados. Os “primers” utilizados para as espécies de *Babesia* spp. amplificam sequências de 88 pares de bases do gene que codifica o citocromo B (Quadro 1).

Quadro 1. Descrição dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de *B. bigemina* e *B. bovis* e tamanho dos produtos de amplificação.

| PCR e qPCR | Nome | Sequência (5’ – 3’) | Tamanho (pb) |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------|
| <i>B. bigemina</i> | (F) ^a cbisg 1 | TGT TCC AGG AGA TGT TGA TTC | 88 |
| | (R) ^a cbisg 2 | AGC ATG GAA ATA ACG AAG TGC | |
| <i>B. bovis</i> | (F) ^a cbosg 1 | TGT TCC TGG AAG CGT TGA TTC | 88 |
| | (R) ^a cbosg 2 | AGC GTG AAA ATA ACG CAT TGC | |

(F)^a = “primer” forward; (R)^a = “primer” reverse, pb = pares de bases.

O DNA extraído de isolados de *B. bovis* e *B. bigemina* cedidos pela Unesp de Jaboticabal (Prof. Rosângela Zacarias Machado) foi usado para padronização e também como controle positivo das reações. Produtos de PCR escolhidos ao acaso foram clonados usando o kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA) e sequenciados no equipamento ABI Prism® 3100 Avant Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram analisadas com o programa BLAST (ALTSCHUL et al.; 1990).

As reações de amplificação foram preparadas para o volume final de 15 μ l, com 7,5 μ l de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,12 μ M de cada “primer” forward e reverse, 5,26 μ l de água ultra pura (Invitrogen, USA) e 2,0 μ l da amostra diluída para 10 ng de DNA. As reações de qPCR foram feitas em duplicata e as condições de incubação no termociclador foram 10 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 15 segundos e 54°C por um minuto. Para prevenir a contaminação, foram usadas ponteiras com barreiras para pipetagem das amostras e, em cada bateria de testes, um controle negativo foi incluído pela adição de 2 μ l de água ultra pura em substituição ao DNA.

Para estimar o número de cópias (NC) de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* nas amostras estudadas, foram construídas curvas de calibração. Os produtos de amplificação foram purificados usando Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up Systems kit (Promega). Os produtos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, diluídos para 100 pg de DNA purificado e novamente diluídos dez vezes, em base dez. Essas diluições foram submetidas à qPCR e, para cada diluição, o número de cópias foi estimado usando a equação proposta por Ke et al. (2006): número de cópias na amostra = $6 \times 10^{23} \times \text{concentração (g/}\mu\text{l)} \div \text{MW (g/mol)}$. Finalmente uma análise de regressão linear foi feita, com a finalidade de obter o coeficiente de angulação da reta e o intercepto da curva padrão. A estimativa do NC do DNA de *Babesia* spp. em cada amostra foi feita usando-se a seguinte fórmula: número de cópias/ μ l = $10^{(Ct-b)/m}$, onde Ct é o ciclo

“threshold”, *b* é o intercepto e *m* é o coeficiente de angulação da reta, esses últimos obtidos da curva padrão. Não foi possível quantificar *B. bigemina* nas amostras de DNA extraídas de sangue dos animais da raça Nelore e assim foram preparadas reações de “nested” PCR (nPCR) para avaliação da prevalência da infecção nesse grupo.

n-PCR para diagnóstico das infecções por *B. bigemina* nos animais da raça Nelore

As reações de n-PCR foram padronizadas utilizando-se uma adaptação do protocolo descrito por Guerrero et al. (2007). Os “primers” usados e os respectivos tamanhos dos amplicons obtidos são mostrados no Quadro 2. Estes “primers” amplificam inicialmente um fragmento do gene 18s, comum tanto a *B. bigemina* como a *B. bovis*, e posteriormente outra reação é preparada a partir da primeira, usando “primers” específicos para *B. bigemina*.

Quadro 2. Descrição dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de *Babesia* spp.; *Babesia bigemina* e do tamanho dos produtos de amplificação.

| | “Primer” | Sequência (5’ – 3’) | Tamanho (pb) |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------|
| PCR <i>Babesia</i> spp. | (F) ^a KB 16 | CAT CAG CTT GAC GGT AGG G | 600 |
| | (R) ^a KB17 | GTC CTT GGC AAA TGC TTT C | |
| n-PCR <i>B. bigemina</i> | (F) ^a KB 18 | GAT GTA CAA CCT CAC CAG AGT ACC | 262 |
| | (R) ^a KB19 | CAA CAA AAT AGA ACC AAG GTC CTA C | |

(F)^a = “primer” forward; (R)^a = “primer” reverse

Todas as reações foram preparadas para o volume final de 25 µl, sendo que a temperatura de anelamento dos “primers” foi de 55 °C, nas reações de PCR e 57 °C para as nPCR. As reações de PCR foram preparadas com 12,5 µl de Master Mix Red Neobio® (150 mM Tris-HCl, 40 mM (NH4)₂SO₄, 40 mM MgCl₂), 1,0 µl de “primer” KB 16 (10µM), 1,0 µl de “primer” KB 17 (10 µM), 5,5 µl de água ultra-pura (Invitrogen) e 5,0 µl de DNA. As reações de n-PCR foram preparadas

do mesmo modo, porém adicionando-se 1,0 μ l de “primer” KB 18 (10 μ M), 1,0 μ l de “primer” KB 19 (10 μ M), 8,5 μ l de água ultra-pura (Invitrogen) e 2,0 μ l da reação de PCR. Para prevenir contaminações, foram usadas ponteiras com barreiras de 10 μ L e 200 μ L (Axygen) e em cada bateria de teste água ultrapura foi colocada em um microtubo com tampão contendo os demais componentes da reação, substituindo o DNA. Logo após a incubação das amostras no termociclador, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2,0% para verificação dos tamanhos dos fragmentos amplificados. A visualização dos produtos de amplificação foi feita usando luz UV e fluoróforo a base de brometo de etídio, sendo que os fragmentos foram comparados a um padrão (Ladder 100 pb, Invitrogen) para verificação dos tamanhos aproximados. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com cerca de 262 pb nas reações de nPCR.

Análise estatística

Os resultados obtidos para NC de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* por qPCR foram transformados em $\log_{10}(n+1)$ e os dados de VG foram analisados usando um modelo que incluiu os efeitos de raça (Angus, Nelore e AxN), idade (bezerros e vacas) e interações. O teste de Tukey-Kramer foi aplicado para comparar as médias. Associações entre qPCR e volume globular (VG) foram investigadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson, dentro de cada raça de acordo com a idade. Foi aplicado o teste exato de Fisher para comparar a prevalência da infecção por *B. bovis* entre grupos raciais e de idade, com base em esfregaços de sangue e detecção de DNA por qPCR, após os dados serem arranjados em tabelas de contingência 2x2 e 2x3. O V.9.1 Statistical Analysis System (SAS, 2002/2003), foi utilizado em todas as análises.

Resultados e discussão

As análises dos esfregaços de sangue permitiram detectar merozoítas de *B. bigemina* (0,1-0,2% de eritrócitos parasitados) em oito dos 75 bezerros estudados, que representaram 10,6% desses animais. Entre esses oito bezerros seis eram da raça Angus, um Nelore e um AxN. O teste exato de Fisher permitiu verificar que as diferenças entre as raças Angus e as demais foram significativas, assim como entre vacas e bezerros ($p < 0,05$). Nas regiões de ocorrência das babesioses bovinas, o comportamento dos animais jovens e adultos difere em vários aspectos. De modo geral, os bezerros são considerados mais resistentes às infecções, porém onde a endemia é estável, como nas áreas estudadas neste experimento, casos clínicos são observados primordialmente nestes animais. Os animais adultos desenvolvem, pela prolongada exposição, sólida resistência e dificilmente adoecem. A ocorrência de casos clínicos nos bezerros pode ser explicada em parte pela queda na imunidade passiva a partir do 28º dia após o nascimento, quando os anticorpos colostrais começam a ser substituídos por aqueles produzidos pelo próprio animal (MADRUGA et al., 1984). A ocorrência de parasitemia patente apenas em bezerros foi observada anteriormente por Oliveira et al., (2005, 2008) em área endêmica do estado de São Paulo, ao estudarem a infecção por *B. bigemina* em vacas e bezerros leiteiros.

Os baixos níveis de parasitemia observados nos bezerros já eram esperados, já que nenhum dos animais usados no experimento apresentavam sinais clínicos de babesioses no momento das colheitas das amostras. Sabe-se que em casos fatais desta doença a porcentagem de eritrócitos parasitados pode chegar a 0,2%, enquanto nos casos com curso clínico menos agudo, se mantém ao redor de 0,001%. O fato de *B. bovis* não ter sido encontrada nos esfregaços, explica-se principalmente pelo fato de que essa espécie tem predileção por capilares viscerais e com isso, a sua detecção na circulação periférica é pouco freqüente (KAKOMA; MEHLHORN, 1994).

Com relação ao VG, as análises estatísticas mostraram efeitos significativos ($p < 0,05$) da raça, da idade e da interação entre esses fatores. Pode observar-se na Tabela 1 que os animais da raça Angus apresentaram médias de VG significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos demais, enquanto Nelore e AxN não diferiram significativamente ($p > 0,05$). A média de VG encontrada para os bezerros, foi maior que a das vacas. No entanto, dentro de raça, apenas no grupo AxN as médias de VG das vacas foram significativamente menores que as dos bezerros ($p < 0,05$). Os animais Angus, tanto vacas quanto bezerros, apresentaram médias de VG baixas, e nos Nelore, as duas categorias apresentaram médias mais altas. Como também pode ser verificado na Tabela 1, os valores de VG para os bezerros AxN foram similares aos dos bezerros Nelore. Já as vacas AxN mostraram médias de VG ligeiramente menores que as vacas Nelore e maiores que as Angus, sem entretanto diferir significativamente de nenhum dos dois ($p > 0,05$).

Tabela 1. Média dos quadrados mínimos e erros padrão do Volume globular (VG, %) de acordo com a raça e idade dos animais.

| Grupo | Idades | | Médias por |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | Bezerros** | Vacas** | grupo** |
| Angus* | 30,18 ^{a,A} ± 1,09 | 33,56 ^{a,A} ± 1,03 | 31,87 ^a ± 0,75 |
| AxN* | 42,50 ^{b,A} ± 1,00 | 37,76 ^{ab,B} ± 1,03 | 40,13 ^b ± 0,72 |
| Nelore* | 42,92 ^{b,A} ± 1,03 | 39,00 ^{b,A} ± 1,03 | 40,96 ^b ± 0,72 |
| Médias por idade* | 38,53 ^A ± 0,60 | 36,77 ^B ± 0,59 | |

*Médias não seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas diferem significativamente ($p < 0,05$).

**Médias não seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas diferem significativamente ($p < 0,05$).

Reduções nos valores de VG são comuns em animais infectados por *Babesia* spp. (ARAGON, 1976; et al., 2003; BENAVIDES e SACCO, 2007). O grau de hemólise está relacionado principalmente à multiplicação dos protozoários dentro dos eritrócitos e da fagocitose dessas células (RADOSTITIS, 2000; ESMAEILNEJAD et al., 2012). Neste experimento foram medidos os níveis de VG em animais cronicamente infectados por *Babesia* spp. e foi observado que os Angus

apresentaram as menores médias para este parâmetro e também níveis de infecção por *B. bovis* significativamente maiores (Tabela 2). Sabe-se, no entanto, que a intensidade da anemia nem sempre é proporcional ao nível de infecção, porque eritrócitos não parasitados podem também ser fagocitados (MURASE et al., 1996). Para os animais Nelore e AxN o nível de infecção foi mais baixo em vacas que em bezerros, porém, esses últimos apresentaram VG mais altos. Observou-se que, dentro de cada raça, de acordo com as idades dos animais, não foram verificadas correlações significativas entre os valores de VG e o NC do DNA de *B. bovis* determinados por qPCR. Goff et al. (2003) observaram que a redução do VG após a infecção por esse protozoário é transitória e de curta duração. Isso pode explicar, pelo menos em parte, os resultados encontrados neste experimento, que indicam que em animais cronicamente infectados, o VG e nível de infecção determinado por qPCR são fenômenos independentes.

Os resultados das quantificações por qPCR para *B. bovis* possibilitaram a detecção de pequenas quantidades de cópias do DNA alvo, em torno de 0,1 fg. A curva padrão construída para estimar o número de cópias do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina*, permitiu a estimativa da quantidade de cópias presentes em todas as amostras analisadas, exceto para *B. bigemina* nos animais Nelore. As análises das curvas de amplificação em cada bateria de testes possibilitou a distinção entre os dois parasitas, que apresentaram temperaturas de dissociação de 74,84 e 71,57 para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Apesar disso, todas as reações foram preparadas separadamente para cada parasita.

As prevalências de infecção por *B. bovis*, determinadas por qPCR para os três grupos genéticos estudados, não diferiram entre si e foram de 100% (50/50), 98,0% (49/50) e 96% (48/50) para os grupos genéticos Angus, AxN e Nelore, respectivamente. Com relação às idades dos animais também não foram verificadas diferenças significativas entre as prevalências para bezerros (97,3%) e vacas (98,6%). As altas prevalências encontradas possibilitam confirmar que as três regiões estudadas apresentam características de estabilidade

endêmica para as babesioses, de acordo com os critérios de Mahoney e Ross (1972). De acordo com esses autores os sistemas de criação classificados como endêmicos estáveis caracterizam-se por apresentar a infecção da grande maioria dos bezerros antes da perda da imunidade passiva, de modo que a constante inoculação dos hemoparasitas pelos carrapatos provoca forte imunidade nos bovinos. Estes achados também confirmam estudos anteriores conduzidos na região de São Carlos onde verificou-se que a região apresentava características de estabilidade endêmica para as babesioses (OLIVEIRA et al., 2005, 2008, OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

Com relação ao NC do DNA de *B. bovis*, quantificada por qPCR, puderam ser verificadas variações tanto dentro, como entre grupos genéticos e idades (Tabela 2). As análises estatísticas mostraram efeitos significativos ($p < 0,05$) da raça, das idades e da interação entre esses fatores. Os bezerros apresentaram níveis de infecção maiores que as vacas. Essa diferença ocorreu principalmente devido aos valores de quantificação observados para os animais Nelore e AxN, nos quais o nível de infecção estimado nas amostras dos bezerros foi maior que nas vacas ($p < 0,05$), enquanto bezerros e vacas Angus mostraram números similares de cópias (Tabela 2). As vacas e os bezerros Angus apresentaram número de cópias de DNA de *B. bovis* significativamente maiores ($p < 0,05$), enquanto os animais AxN não diferiram ($p > 0,05$) dos Nelore, nas duas faixas etárias estudadas. Estes resultados possibilitam supor que os animais zebu são capazes de desenvolver uma resposta imune mais eficiente contra a *B. bovis* que os taurinos. Uma das explicações prováveis é que o gado zebu tem uma história de longo contato com carrapatos e babesias, ao contrário dos animais de origem europeia. A similaridade entre os animais do grupo Nelore e AxN com relação aos níveis de infecção por *B. bovis* pode ser ainda um indicativo da ocorrência de um padrão de transmissão genética que inclui efeitos heteróticos. De qualquer modo, é necessário lembrar que as contagens de carrapatos nos animais Angus são geralmente mais altas que nos animais Nelore e cruzados (UTECH e WHARTON, 1982; WAMBURA et al., 1998; SILVA et al., 2007). Além disso,

como os animais eram criados em diferentes propriedades, e mesmo entre animais criados na mesma propriedade, o manejo aplicado aos diferentes grupos genéticos é sempre diferente, tornando praticamente impossível separar estatisticamente os efeitos de grupo genético de alguns efeitos de ambiente que possam estar envolvidos na determinação do nível de infecção por *Babesia* spp. Assim as diferenças encontradas precisam ser melhor investigadas.

Os dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 mostraram que para bezerros e vacas, os grupos genéticos com maiores médias de VG foram também os que mostraram os menores níveis de infecção por *B. bovis*, com exceção das vacas Nelore. Porém para esses animais a correlação estimada entre VG e nível de infecção foi -0,29, enquanto que para cada raça, de acordo com idade, ficaram muito próximas de zero, variando entre -0,05 a 0,05 e em todos os casos não significativa.

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos e erros-padrão do número de cópias (log 10) do DNA de *Babesia bovis* obtida por meio da técnica de qPCR, de acordo com a raça e idade dos animais.

| Raça | Idade | | Médias por |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Bezerros** | Vacas** | grupo** |
| Angus* | 5,81 ^{a,A} ± 0,12 | 5,69 ^{a,A} ± 0,11 | 5,75 ^a ± 0,08 |
| AxN* | 4,72 ^{b,A} ± 0,11 | 3,85 ^{b,B} ± 0,11 | 4,29 ^b ± 0,08 |
| Nelore* | 4,47 ^{b,A} ± 0,11 | 3,70 ^{b,B} ± 0,11 | 4,08 ^b ± 0,08 |
| Médias por idade * | 5,00 ^A ± 0,07 | 4,41 ^B ± 0,07 | |

*Médias não seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente (P < 0,05).

** Médias não seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas diferem significativamente P < 0,05).

Não foi possível estimar o nível de infecção por *B. bigemina* nos animais da raça Nelore pelo método da qPCR, porque os valores de Ct encontrados não estavam dentro dos limites incluídos na curva de calibração construída para quantificação. Estes achados nos levaram a supor que esses animais poderiam apresentar níveis de infecção por *B. bigemina* menores que os demais grupos genéticos estudados. Apesar

disso, a análise das amostras de DNA dos animais Nelore por n-PCR (Figura 1) possibilitou detectar 92% (46/50) de animais positivos, sendo 84% das vacas (21/25) e 100% dos bezerros (25/25).

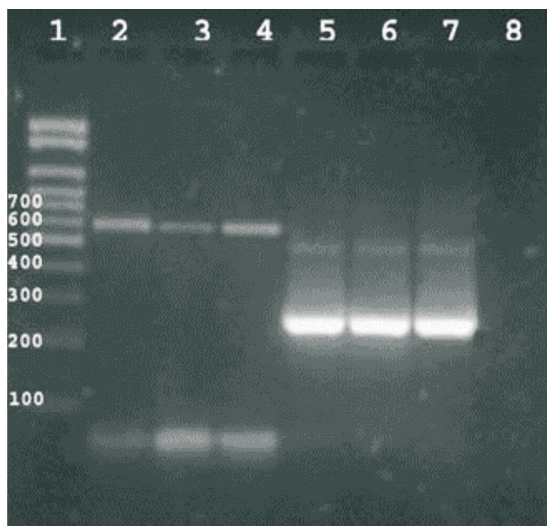


Figura 1. Eletroforese dos produtos de amplificação do DNA de *Babesia bigemina* pelas técnicas de PCR e n-PCR. Poço 1: padrão de tamanho molecular, poços 2, 3 e 4: produtos de amplificação do DNA de *Babesia* spp. com 600 pb, poços 5, 6 e 7: produtos de amplificação de *B. bigemina* por nPCR com 262 pb; poço 8: controle negativo da reação.

As análises de qPCR para os animais Angus e cruzados mostraram 100% de prevalência da infecção por *B. bigemina* e foi possível a quantificação em todos os animais. A análise do número de cópias de DNA de *B. bigemina*, mostrou variações tanto dentro, como entre grupos genéticos e idades (Tabela 3). Os bezerros Angus apresentaram número de cópias de DNA de *B. bigemina* significativamente maiores, que os AxN.

Tabela 3. Média dos quadrados mínimos e erros-padrão do número de cópias (log 10) do DNA de *Babesia bigemina* obtida por meio da técnica de qPCR, de acordo com a raça e idade dos animais.

| Raça | Bezerros | Vacas | Médias por grupo |
|-------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Angus | 4,80 ^{a.A} ± 0,17 | 3,58 ^{a.B} ± 0,15 | 4,18 ^a ± 0,11 |
| AxN | 3,62 ^{b.A} ± 0,15 | 3,32 ^{a.A} ± 0,15 | 3,47 ^b ± 0,11 |
| Média | 4,20 ^A ± 0,11 | 3,45 ^B ± 0,11 | |

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na coluna, e letras maiúsculas iguais, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey (p>0,05)

De modo geral as técnicas de PCR usadas neste experimento tornaram possível estimar a prevalência e o nível de infecção por *Babesia* spp. em bovinos de diferentes grupos genéticos. As qPCR para *B. bovis* permitiram verificar diferenças nos níveis de infecção entre os grupos, mostrando uma grande similaridade entre os animais Nelore e AxN. Embora não seja possível concluir se a quantidade de carrapatos ou a resistência imunológica desenvolvida pelo animal são a causa das diferenças, estes achados estão de acordo com a ideia que animais cruzados *Bos taurus* X *B. indicus*, que frequentemente são criados nas regiões estudadas aqui, podem ser a melhor maneira de criar animais mais produtivos, prevenindo as perdas severas resultantes das babesioses.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular and Biological** , v. 215, p. 403-410, 1990.

AL-KHEDERY, B.; ALLRED, D. R. Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family, within a bidirectional locus of active transcription. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 402-414, 2006.

ALLRED, D. R.; CINQUE, R.; M.; LANE, T. J.; AHRENS, K.; P. ; Anti-genic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis* infected erythrocytes. **Infection and immunity**, v. 62, n.1, p. 91-98, 1994.

ARAGON, R. S. *Bovine babesiosis*: A review. **Veterinary Bulletin**, v. 46, n. 12, p. 903-917, 1976.

BENAVIDES, M. V.; SACCO, A. M. S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v.150, p. 54-64, 2007.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BOCK, R. E.; de VOS, A. J.; KINGSTON, T. G.; McLELLAN, D. J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-40, 1997.

BOCK, R. E.; JACKSON, I.; DE VOS, A. J.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 247-69, 2004.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J. C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.16-25, 2007.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient Transmission. **Vet Res.** 40, 37, 2009.

ESMAEILNEJAD, B.; TAVASSOLI, M.; ASRI-REZAEI, S.; DALIR-NAGHADEH, B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 124-130, 2012.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; HORN, R. H.; BARRINGTON, G. M.; KNOWLES, D. P. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 185-188, 2003.

GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Ed.). **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Embrapa: Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte, 1998. p.10-46

GONZALES, J. C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Porto Alegre: Edição do Autor, 2003. 80 p.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, p. 8-10, 2002.

GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in South Texas. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 156-163, 2007.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*), **Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 89, p. 297-305, 2000.

KAKOMA, I.; MELHORN, H. *Babesia* of Domestic Animals. In: KREIER, J. P. (Ed). **Parasitic Protozoa**, New York: Academic Press, 1994. p. 141-216.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 8, p. 931-935, 1983.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1163-1168, 1984.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 292-8, 1972.

MURASE, T.; UEDA, T.; YAMATO, O.; TAJIMA, M.; MAEDE, Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 259-261, 1996.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 10, p. 1267-1271, 1989.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 61-67, 2005.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M. de; NÉO, T. A.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, H. N. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 281-286, 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal Parasitology**, v. 35, p. 105-111, 2005.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9. ed. London: W.B. Saunders, 1877. p. 2000.

SAS, Institute Inc.; **SAS/STAT**. User's Guide, version 6.11, 4. ed.; v.2, Cary: 2002/2003. 842 p.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M. de; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI JÚNIOR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 1150-1155, 2007.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 19-41, 1995.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H. Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 41 – 46, 1982.

WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Veterinary Parasitology*, v. 77, p. 63-70, 1998.